

(10)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 1 067 193 A1

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

10.01.2001 Patentblatt 2001/02

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/77, C12N 15/70,

C12N 15/53, C12N 15/54,

C12N 15/63, C12N 9/10,

C12P 13/08, C12N 1/21

(21) Anmeldenummer: 00114502.8

(22) Anmelddatum: 06.07.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 07.07.1999 DE 19931314

(71) Anmelder:

- Degussa-Hüls Aktiengesellschaft  
60287 Frankfurt am Main (DE)
- Forschungszentrum Jülich  
52456 Jülich (DE)

(72) Erfinder:

- Kreutzer, Caroline  
49326 Melle (DE)
- Möckel, Bettina, Dr.  
40597 Düsseldorf (DE)
- Pfefferle, Walter, Dr.  
33790 Halle (DE)
- Eggeling, Lothar, Dr.  
52428 Jülich (DE)
- Sahm, Hermann, Prof.  
52428 Jülich (DE)
- Patek, Miroslav  
10600 Praha 10 (CZ)

### (54) L-Lysin produzierende coryneforme Bakterien und Verfahren zur Herstellung von Lysin

(57) Die Erfindung betrifft L-Lysin produzierende Stämme coryneformer Bakterien mit verstärktem pyc-Gen (Pyruvat-Carboxylase-Gen), in denen zusätzliche Gene, ausgewählt aus der Gruppe dapA-Gen (Dihydridopicolinat-Synthase-Gen), lysC-Gen (Aspartat-Kinase-Gen), lysE-Gen (Lysin-Export-Carrier-Gen), dapB-Gen (Dihydridopicolinat-Reduktase-Gen), insbesondere aber das dapA-Gen verstärkt insbesondere überexprimiert werden und ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin.

**Beschreibung**

[0001] Die Erfindung betrifft L-Lysin produzierende Stämme coryneformer Bakterien mit verstärktem pyc-Gen (Pyruvat-Carboxylase-Gen), in denen zusätzliche Gene, ausgewählt aus der Gruppe dapA-Gen (Dihydrodipicolinat-Synthase-Gen), lysC-Gen (Aspartat-Kinase-Gen), lysE-Gen (Lysin-Export-Carrier-Gen), dapB-Gen (Dihydrodipicolinat-Reduktase-Gen), insbesondere aber das dapA-Gen verstärkt insbesondere überexprimiert werden und ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin.

**Stand der Technik**

[0002] L-Lysin ist eine kommerziell bedeutende L-Aminosäure, die insbesondere als Futtermittelzusatz in der Tierernährung Anwendung findet. Der Bedarf steigt in den letzten Jahren ständig an.

[0003] L-Lysin wird fermentativ mit L-Lysin produzierenden Stämmen coryneformer Bakterien insbesondere mit *Corynebacterium glutamicum* hergestellt. Wegen der großen Bedeutung dieses Produktes wird ständig an der Verbesserung des Herstellverfahrens gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für Aminosäuren wie z.B. L-Leucin sind und L-Lysin produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Lysin produzierender Stämme von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt, indem man einzelne Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Lysin-Produktion untersucht.

[0006] So wird in EP-A-0 088 166 über die Leistungssteigerung nach Amplifikation eines Resistenz gegen Amnoethylcystein vermittelnden DNA-Fragmentes berichtet. In EP-B-0 387 527 wird über die Leistungssteigerung nach Amplifikation eines für eine „feed back“ resistente Aspart-Kinase kodierenden lysC-Allels berichtet. In EP-B-0 197 335 wird über die Leistungssteigerung nach Amplifikation des für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierenden dapA-Gens berichtet. In EP-A-0 219 027 wird über die Leistungssteigerung nach Amplifikation des für die Aspartatsemialdehy-

Dehydrogenase kodierenden asd-Gens berichtet. Pisabarro et al. (Journal of Bacteriology, 175(9), 2743-2749, (1993)) beschreiben das für die Dihydrodipicolinat-Reduktase kodierende dapB-Gen.

[0007] Weiterhin wurde auch die Wirkung der Amplifikation von Genen des Primärstoffwechsels auf die Produktion von L-Lysin untersucht. So wird in EP-A-0 219 027 über die Leistungssteigerung nach Amplifikation des für die Aspartat-Aminotransferase kodierenden aspC-Gens berichtet. In EP-B-0 143 195 und EP-B-0 358 940 wird über die Leistungssteigerung nach Amplifikation des für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierenden ppc-Gens berichtet. In der DE-A-198 31 609 wird über die Leistungssteigerung nach Amplifikation des für die Pyruvat-Carboxylase kodierenden pyc-Gens berichtet. Der durch die Pyruvatcarboxylase katalysierten anaplerotischen Reaktion kommt im Vergleich zu der durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase katalysierten Reaktion eine besondere Bedeutung zu. So zeigten Wendisch et al. (FEMS Microbiology Letters 112, 269-274 (1993)), dass die Ausschaltung des ppc-Gens die Lysin-Produktion des Stammes MH20-22B nicht beeinträchtigte.

[0008] Schließlich wird in der Offenlegungsschrift DE-A-195 48 222 beschrieben, daß eine gesteigerte Aktivität des vom lysE-Gen kodierten L-Lysin-Exportcarriers die Lysin-Produktion fördert.

[0009] Neben diesen Ansätzen zur Amplifikation eines einzelnen Gens wurden auch Ansätze verfolgt, zwei oder mehrere Gene gleichzeitig zu amplifizieren, und dadurch die L-Lysin-Produktion in coryneformen Bakterien zu verbessern. So wird in der Offenlegungsschrift DE-A-38 23 451 über die Leistungssteigerung nach gleichzeitiger Amplifikation des asd-Gens und des dapA-Gens von *Escherichia coli* berichtet. Aus der Offenlegungsschrift DE-A-39 43 117 ist die Leistungssteigerung nach gleichzeitiger Amplifikation eines für eine „feed back“ resistente kodierenden lysC-Allels und des dapA-Gens bekannt. In der EP-A-0 841 395 wird insbesondere über die Leistungssteigerung bei gleichzeitiger Amplifikation eines für eine „feed back“ resistente kodierenden lysC-Allels und des dapB-Gens berichtet; durch zusätzliche Amplifikation der Gene dapB, lysA und ddh konnten weitere Verbesserungen erzielt werden. In der EP-A-0 854 189 wird die Leistungssteigerung bei gleichzeitiger Amplifikation eines für eine „feed back“ resistente kodierenden lysC-Allels, des dapA-Gens, des dapB-Gens, des lysA-Gens und des aspC-Gens beschrieben. In der EP-A-0 857 784 wird insbesondere über die Leistungssteigerung bei gleichzeitiger Amplifikation eines für ein „feed back“ resistentes kodierendes lysC-Allel und des lysA-Gens berichtet; durch zusätzliche Amplifikation des ppc-Gens konnte eine weitere Verbesserung erzielt werden.

[0010] Aus der Vielzahl der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren wird deutlich, daß ein Bedarf an der Entwicklung neuer Ansätze und der Verbesserung bestehender Verfahren zur Lysin-Produktion mit coryneformen Bakterien besteht.

## Aufgabe der Erfindung

[0011] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue L-Lysin produzierende Stämme coryneformer Bakterien und Verfahren zur Herstellung von L-Lysin bereitzustellen.

5

## Beschreibung der Erfindung

[0012] L-Lysin ist eine kommerziell bedeutende L-Aminosäure, die insbesondere als Futtermittelzusatz in der Tierernährung Anwendung findet.

10 [0013] Wenn im folgenden Text L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, so sind damit nicht nur die Base, sondern auch die entsprechenden Salze wie z.B. Lysin-Hydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

[0014] Gegenstand der Erfindung sind L-Lysin produzierende Stämme coryneformer Bakterien mit verstärktem pyc-Gen (Pyruvat-Carboxylase-Gen), die dadurch gekennzeichnet sind, daß zusätzliche Gene, ausgewählt aus der Gruppe dapA-Gen (Dihydridopicolinat-Synthase-Gen), lysC-Gen (Aspartat-Kinase-Gen), lysE-Gen (Lysin-Export-Carrier-Gen), dapB-Gen (Dihydridopicolinat-Reduktase-Gen), insbesondere aber das dapA-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

15 [0015] Weiterhin wurde die neue DNA-Sequenz gefunden, die stromaufwärts (5'-Bereich) des dapB-Gens liegt, welche die -35-Region des dapB-Promotors trägt und vorteilhaft für die Expression des dapB-Gens ist. Sie ist als SEQ-ID-No. 1 dargestellt.

20 [0016] Es wird daher ebenfalls eine entsprechende replizierbare DNA beansprucht mit der Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1.

[0017] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die Mutationen MC20 und MA16 des dapA-Promotors dargestellt in SEQ-ID-No. 5 und SEQ-ID-No. 6., hinterlegt in den Stämmen DSM 12868 und DSM 12867.

25 [0018] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind L-Lysin produzierende Stämme coryneformer Bakterien mit verstärktem pyc-Gen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß zusätzlich gleichzeitig das dapA- und das dapB-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0019] Gegenstand der Erfindung sind ebenso L-Lysin produzierende Stämme coryneformer Bakterien mit verstärktem pyc-Gen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß zusätzlich gleichzeitig das dapA-, das dapB- und das lysE-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

30 [0020] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

35 [0021] Ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin unter Verwendung der oben beschriebenen Bakterien ist ebenso Gegenstand der Erfindung.

[0022] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen, insbesondere aus Glucose oder Saccharose. Es handelt sich um coryneforme Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen,

40 die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt, ist Aminosäuren zu produzieren. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Brevibacterium flavum ATCC14067, Corynebacterium melassecola ATCC17965 und davon abgeleitete Stämme bzw. Mutanten. Beispiele für L-Lysin produzierende Mutanten coryneformer Bakterien sind beispielsweise

45 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Brevibacterium flavum FERM-P 6463

Brevibacterium flavum FERM-P 6464

50 Corynebacterium glutamicum DSM 5714

Corynebacterium glutamicum DSM 12866

[0023] Die Erfinder fanden nun heraus, dass eine zusätzlich zum pyc-Gen verstärkte Expression des lysE-Gens, oder eine zusätzlich verstärkte Expression eines für eine „feed back“ resistente Aspartatkinase kodierenden lysC-Allels, oder eine zusätzlich verstärkte Expression des dapB-Gens und insbesondere eine zusätzlich verstärkte Expression des dapA-Gens, einzeln oder gemeinsam, die Produktion von L-Lysin weiter verbessern.

55 [0024] Es wurde ebenso gefunden, dass bei gegebener Überexpression des pyc-Gens die gleichzeitige, die zusätzlich verstärkte Expression des dapA- und des dapB-Gens weitere Vorteile für die Produktion von L-Lysin bringt.

[0025] Darüberhinaus fanden die Erfinder schließlich heraus, dass bei gegebener Überexpression des pyc-Gens die gleichzeitige, zusätzlich verstärkte Expression des dapA-, dapB- und des lysE-Gens äußerst vorteilhaft für die Produktion von L-Lysin sind.

[0026] Zur Erzielung einer Verstärkung (Überexpression) erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin-Bildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmiden (Pendelvektoren) mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0027] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0028] Die erfindungsgemäß verwendeten Gene von *Corynebacterium glutamicum* sind beschrieben und können mit bekannten Methoden isoliert bzw. hergestellt oder synthetisiert werden.

[0029] Methoden zur ortsspezifischen Mutagenese sind unter anderem bei Higuchi et al. (Nucleic Acids Research 16: 7351 - 7367 (1988)) oder bei Silver et al. im Handbuch von Innis, Glefand und Sninsky (eds.): PCR Strategies (Academic Press, London, UK, 1995) beschrieben.

[0030] Zur Isolierung eines interessierenden Gens von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in z.B. *E. coli* oder gegebenenfalls auch in *C. glutamicum* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252: 255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norlander et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. In gleicher Weise können auch Pendelvektoren wie z.B. pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220, 478-480 (1990)) oder pEC5 (Eikmanns et al., 1991, Gene 102, 93-98), die in *E. coli* und *C. glutamicum* replizieren, verwendet werden. Als Wirtseignen sich besonders solche Stämme, die restriktions- und/oder rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Ein anderes Beispiel hierfür sind die restriktionsdefekten *C. glutamicum* Stämme RM3 und RM4, die bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60(2), 756-759, (1994)) beschrieben sind.

[0031] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et. al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-347) überführt. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten Quellen oder Stammsammlungen wie z.B. dem Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) erhältlich oder werden gegebenenfalls selbst hergestellt. Als Beispiel eines derartigen Indikatorstamms sei der meso-Diaminopimelinsäure bedürftige *E. coli* Stamm RDA8 (Richaud et al. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III 293: 507-512 (1981)) genannt, der eine Mutation (dapA: :Mu) im dapA-Gen trägt.

[0032] Nach Transformation des Indikatorstamms mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen trägt, und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft prototroph. Vermittelt das klonierte DNA-Fragment Resistenz z.B. gegen einen Antimetaboliten wie S-(2-Aminoethyl)-Cystein kann die Identifizierung des das rekombinante Plasmid tragenden Indikatorstamms durch Selektion auf entsprechend supplementierten Nährböden erfolgen.

[0033] Bei bekannter bzw. in einer Datenbank zugänglichen Nukleotidsequenz der interessierenden Genregion

kañn die chromosomale DNA mit bekannten Methoden wie z.B. bei Eikmanns et al. (*Microbiology* 140, 1817-1828, (1994)) beschrieben isoliert und das betreffende Gen durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung geeigneter Primer synthetisiert und in einen geeigneten Plasmidvektor wie z.B. pCRII TOPO der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) kloniert werden. Eine Zusammenfassung zur PCR-Methodik kann dem Buch von Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) entnommen werden.

[0034] Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

[0035] Die Isolierung und Klonierung des pyc-Gens von *C. glutamicum* ATCC13032 ist in der DE-A-198 31 609 und bei Koffas et al (*Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 346-352 (1998)) beschrieben. Die Nukleotidsequenz des pyc-Gens ist unter der accession number AF038548 oder Y09548 zugänglich.

[0036] Die Isolierung und Klonierung des lysE-Gens von *C. glutamicum* ATCC13032 ist in der Offenlegungsschrift DE-A-195 48 222 beschrieben. Die Nukleotidsequenz des lysE-Gens ist unter der accession number X96471 zugänglich.

[0037] Die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung des dapA-Gens verschiedener Stämme von *C. glutamicum* sind bei Cremer et al. (*Molecular and General Genetics* 220:478-480 (1990)), bei Pisabarro et al. (*Journal of Bacteriology* 175:2743-2749 (1993)) und bei Bonnassie et al. (*Nucleic Acids Research* 18:6421 (1990)) beschrieben. In der DE-A-39 43 117 wird über die Verstärkung des dapA-Gens mittels des Plasmides pJC23 berichtet. Die Nukleotidsequenz des dapA-Gens ist unter der accession number X53993 zugänglich.

[0038] Die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung des dapB-Gens von *Brevibacterium lactofermentum* ist bei Pisabarro et al. (*Journal of Bacteriology* 175:2743-2749 (1993)) beschrieben. Die Nukleotidsequenz des dapB-Gens ist unter der accession number X67737 zugänglich.

[0039] Die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung des lysC-Gens und von lysC-Allelen, die für eine „feed back“-resistente Aspartatkinase kodieren wird von mehreren Autoren berichtet. So berichten Kalinowski et al. (*Molecular and General Genetics* 224:317-324 (1990)) über das lysC-Allel des Stammes *C. glutamicum* DM58-1. In der DE-A-39 43 117 wird über die Klonierung des lysC-Allels des *C. glutamicum* Stammes MH20 berichtet. Follettie et al. (*Journal of Bacteriology* 175: 4096-4103 (1993)) berichten über das lysC-Allel des Stammes *C. flavum* N13, das dort als ask bezeichnet wird. Die Nukleotidsequenzen des lysC-Gens und verschiedener lysC-Allele sind unter anderem unter der accession number X57226 und E06826 zugänglich.

[0040] Die auf diese Weise gewonnenen Gene können dann unter anderem in Plasmidvektoren wie z.B. pJC1 (Cremer et al., *Molecular and General Genetics* 220, 478-480 (1990)) oder pEC5 (Eikmanns et al., 1991, *Gene* 102, 93-98) einzeln oder in geeigneten Kombinationen eingebaut und in gewünschten Stämmen coryneformer Bakterien z.B. den Stamm MH20-22B (Schrumpf et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:566-571 (1992)) durch Transformation wie z.B. bei Thierbach et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 356-362 (1988)) oder Elektroporation wie z.B. bei Dunican und Shivnan (*Bio/Technology* 7,1067-1070 (1989)) eingebaut und zur Expression gebracht werden. Es ist gleichfalls möglich den auszuwählenden Stamm mit zwei Plasmidvektoren, die jeweils das betreffende Gen oder die betreffenden Gene enthalten, zu transformieren und dadurch die vorteilhafte gleichzeitig verstärkte Expression zweier oder mehrerer Gene zusätzlich zur bekannten Verstärkung des pyc-Gens zu erzielen.

[0041] Beispiele für derartige Stämme sind

- 40 • der Stamm MH20-22B/pJC23/pEC7pyc bei dem das pyc- und das dapA-Gen gleichzeitig verstärkt exprimiert sind oder
- 45 • der Stamm MH20-22B/pJC33/pEC7pyc bei dem das pyc- und das lysC (FBR) -Allel gleichzeitig verstärkt, insbesondere überexprimiert sind oder
- 50 • der Stamm MH20-22B/pJC23/pEC7dapBpyc bei dem das pyc-, das dapA- und das dapB-Gen gleichzeitig verstärkt, insbesondere überexprimiert sind oder
- 55 • der Stamm MH20-22B/pJC23/pEC7lysEdapBpyc bei dem das pyc-, das dapA-, das dapB- und das lysE-Gen gleichzeitig verstärkt, insbesondere überexprimiert sind.

[0042] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der L-Lysin-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (*Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0043] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenster Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, wie z. B. Palmitinsäure, Stearinäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0044] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an L-Lysin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0045] Die Konzentration an gebildetem L-Lysin kann mit Hilfe von Aminosäure-Analysatoren durch Jonenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion, wie bei Spackmann et al. (Analytical Chemistry 30, 1190 (1958)) beschrieben, bestimmt werden.

[0046] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7pyc als DSM12870
- Escherichia coli K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7dapBpyc als DSM12873
- Escherichia coli K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7lysEdapBpyc als DSM12874
- Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pJC23 als DSM12869
- Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715aecD: :dapA(MA16) als DSM12867
- Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715aecD: :dapA(MC20) als DSM12868
- Corynebacterium glutamicum Stamm DM 678 als DSM 12866
- Escherichia coli K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7lysEpyc als DSM12872
- Escherichia coli K12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7dapBlysE, hinterlegt als DSM12875
- Escherichia coli K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7lysE, hinterlegt als DSM12871

#### Beispiele

[0047] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

## Beispiel 1

## Gewinnung der für lysE codierenden DNA

- 5 [0048] Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde mit den üblichen Methoden (Eikmanns et al., Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomal DNA isoliert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein DNA Fragment amplifiziert, das das lysE Gen trägt. Aufgrund der für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des lysE Gens (Vrljic et al., Molecular Microbiology 22(5), 815 - 826 (1996)) (Accession number X96471) wurden die folgenden Primer-Oligonukleotide für die PCR ausgewählt:

10 LysBam1:

5' CTC GAG AGC (GGA TCC) GCG CTG ACT CAC C 3'

15 LysBam2:

5' GGA GAG TAC GGC (GGA TCC) ACC GTG ACC 3'

- 20 [0049] Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) die PCR Reaktion durchgeführt. Die Primer ermöglichen die Amplifizierung eines ca. 1,1 kb großen DNA-Fragmentes, welches das lysE Gen trägt. Außerdem enthalten die Primer die Sequenz für die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease BamHI, die in der oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Klammern markiert ist.

- 25 [0050] Das amplifizierte DNA Fragment von ca. 1,1 kb, welches das lysE Gen trägt, wurde mittels Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel identifiziert, aus dem Gel isoliert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. No. 28704) der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

- 30 [0051] Anschließend erfolgte die Ligation des Fragmentes mittels T4 DNA Ligase der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) in den Vektor pUC18 (Norlander et al., Gene (26) 101 - 106 (1983)). Hierzu wurde der Vektor pUC18 mit der Restriktionsendonuklease SmaI vollständig geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 50 mg/l Ampicillin supplementiert worden war. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante isoliert, durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym BamHI mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Das Plasmid wurde pUC18lysE genannt.

## Beispiel 2

## Gewinnung von dapB

- 40 [0052] Chromosomal DNA wurde wie in Beispiel 1 angegeben aus dem *Corynebacterium glutamicum* Stamm ATCC 13032 isoliert. Die Sequenz des dapB Gens als solcher aus *Corynebacterium glutamicum* ist bekannt (Accession number X67737). Jedoch umfaßt die veröffentlichte DNA Sequenz nur 56 bp vor dem Translationsstart. Daher wurde zusätzlich der 5' Bereich vor dem Translationsstart sequenziert.

- 45 [0053] Dazu wurde mit dem Plasmid pJC25 (EP-B 0 435 132) und unter Verwendung eines Primer-Oligonukleotides, welches in der Region der bekannten dapB Sequenz (Accession number X67737) bindet, die Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenz des verwendeten Sequenzierungsprimers war:

50 5' GAA CGC CAA CCT TGA TTC C 3'

- 55 [0054] Die Sequenzierung erfolgte nach der bei Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (74) 5463 - 5467 (1977) beschriebenen Kettenabbruch-Methode. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die elektrophoretische Analyse und Detektion der Sequenzierprodukte wurde mit dem A.L.F.-DNA-Sequenzer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) durchgeführt.

- [0055] Die erhaltene DNA Sequenz wurde zur Auswahl eines zweiten Primers verwendet, um weitere Sequenzdaten vor dem Transkriptionstart zu erhalten. Dazu wurde folgender Primer ausgewählt:

5' CTT TGC CGC CGT TGG GTT C 5'

[0056] Die Sequenzierungsreaktion erfolgte wie oben beschrieben. Die neue Sequenz stromaufwärts des dapB-Gens ist als SEQ ID NO 1 dargestellt. Die Sequenz inklusive der Nukleotidabfolge des dapB-Gens ist als SEQ ID NO 2 dargestellt.

[0057] Das dapB Gen wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Dazu wurden von der Firma MWG Biotech zwei Primer-Oligonukleotide synthetisiert die aufgrund der bekannten DNA-Sequenz des dapB Gens ausgewählt wurden:

10 P-dap:

5' (AAG CTT) AGG TTG TAG GCG TTG AGC 3'

15 dapall:

5' TTA ACT TGT TCG GCC ACA GC 3'

[0058] Der 5' Primer (Primer P-dap) enthält eine HindIII Schnittstelle, die in der oben dargestellten Sequenz durch Klammern markiert ist. Die Durchführung der PCR erfolgte gemäß Beispiel 1. Auf diese Weise wurde ein ca 1,1 kb 20 DNA-Fragment amplifiziert, welches das dapB Gen trägt und an beiden Enden jeweils eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease HindIII enthält. Das erhaltene PCR Fragment wurde aus dem 0,8%igen Agarosegel aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) und mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande, Cat. No K4550-01) in den Klonierungsvektor pCR2.1TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm TOP10F<sup>r</sup> der Firma Invitrogen, transformiert, der Transformationsansatz 25 auf Kanamycin (50 mg/l) haltigem LB-Agar mit IPTG (0,16mM) und X-Gal (64 mg/l) ausplattiert und Kanamycin-resistente und weiß gefärbte Kolonien isoliert. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym HindIII und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die DNA Sequenz des amplifizierten DNA Fragmentes wurde durch Sequenzierung 30 überprüft. Die Sequenz des PCR Produktes stimmt mit der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz überein. Das erhaltene Plasmid wurde pCR2.1TOPOdapB genannt.

### Beispiel 3

#### Gewinnung der für pyc codierende DNA

[0059] Der Corynebacterium glutamicum Stamm ATCC 13032 wurde als Donor für die chromosomale DNA verwendet. Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde wie in Beispiel 1 beschrieben chromosomal DNA isoliert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein DNA Fragment amplifiziert, welches das pyc Gen trägt. Aufgrund der für C. glutamicum bekannten Sequenz des pyc Gens (Peters-Wendisch et al., 1998. Microbiology, 144, 915 - 927) (Accession number Y09548) wurden folgende Primer-Oligonukleotide für die PCR ausgewählt:

5-PYC-IN:

5' GC(T CTA GA)A GTG TCG CAA CCG TGC TTG A 3'

45

3-PYC-IN:

5' GC(T CTA GA)T TGA GCC TTG GTC TCC ATC T 3'

[0060] Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) die PCR Reaktion durchgeführt. Die Primer ermöglichen die Amplifizierung eines ca 3,8 kb großen DNA-Fragmentes, welches das pyc Gen trägt. Außerdem enthalten die Primer die Sequenz für eine Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI, die in der oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Klammern markiert ist.

[0061] Das amplifizierte DNA Fragment von ca 3,8 kb, welches das pyc Gen trägt, wurde über Gelelektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel identifiziert und aus dem Gel isoliert und mit den üblichen Methoden aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).

[0062] Anschließend erfolgte die Ligation des Fragmentes mittels Dual Promotor Topo TA Cloning Kit (Invitrogen,

Leek, Niederlande Cat. Number K4600-01) in den Vektor pCRII-TOPO. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm TOP10 (Invitrogen, Leek, Niederlande) transformiert. Die Selektion von Plasmid tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf Kanamycinhaltigem LB Agar (50 mg/l) mit X-Gal (64 mg/l)

- 5 [0063] Das erhaltene Plasmid wurde nach Isolierung der DNA mittels Restriktionsspaltung überprüft und im Agarosegel identifiziert. Das Plasmid wurde pCRII-TOPOpyc genannt und die DNA-Sequenz des klonierten Inserts wurde zur Kontrolle sequenziert. Da die ermittelte Sequenz des pyc-Insert in pCRII-TOPOpyc mit der Sequenz des Genbank-eintrages übereinstimmt, wurde dieses Plasmid weiterverwendet.

#### Beispiel 4

- 10 10 Klonierung von dapB im Vektor pEC7

[0064] Aus dem Plasmid pCR2.1TOPOdapB (aus Beispiel 2) wurde ein ca. 1,1 kb großes DNA Fragment, welches das dapB Gen trägt isoliert. Das Plasmid pCR2.1TOPOdapB wurde dazu mit dem Restriktionsenzym HindIII vollständig verdaut und das ca 1,1 kb große DNA Fragment mit dem dapB Gen isoliert.

- 15 [0065] Das dapB Fragment wurde in den Vektor pEC7 inseriert. Der Vektor pEC7 basiert auf dem E. coli - C. glutamicum Shuttle Vektor pEC5 (Eikmanns et al., 1991, 102: 93 - 98). Aus dem Plasmid pEC5 wurde diejenige BamHI Schnittstelle, die nicht im Polylinker positioniert ist, auf folgende Weise entfernt: Das Plasmid pEC5 wurde partiell mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten. Das ca 7,2 kb große DNA Fragment wurde aus dem Agarosegel isoliert und 20 die überstehenden Enden mit der Klenow-Polymerase (Boehringer Mannheim) aufgefüllt. Das so erhaltene DNA Fragment wurde ligiert (T4-Ligase, Boehringer Mannheim). Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und Kanamycin resistente Kolonien auf LB Agar mit Kanamycin (50 mg/l) isoliert. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen) und durch Restriktionsspaltung mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI überprüft. Das so erhaltene Plasmid wurde pEC6 genannt.

- 25 [0066] Das Plasmid pEC6 wurde mit dem Restriktionsenzym Xhol vollständig gespalten. Ein DNA-Fragment, welches den trp-Terminator trägt, wurde mit dem Vektor DNA Fragment ligiert (T4-Ligase, Boehringer Mannheim). Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und Kanamycin resistente Kolonien auf LB Agar mit Kanamycin (50 mg/l) isoliert. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen) und durch Restriktionsspaltung mit den Restriktionsenzymen BamHI und Xhol überprüft. Das so erhaltene Plasmid wurde pEC7 genannt.

- 30 [0067] Das erhaltene dapB-tragende DNA Fragment wurde mit dem Vektor pEC7 ligiert (T4 DNA Ligase, Boehringer Mannheim), der ebenfalls mit dem Restriktionsenzym HindIII vollständig verdaut und mit alkalischer Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Boehringer Mannheim) behandelt worden war.

- 35 [0068] Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und Kanamycin resistente Kolonien auf LB Agar mit Kanamycin (50 mg/l) isoliert. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen) und durch Restriktionsspaltung mit dem Restriktionsenzym HindIII überprüft. Das so erhaltene Plasmid wurde pEC7dapB (Abbildung 1) genannt. Der erhaltene Escherichia coli Stamm wurde DH5 $\alpha$ /pEC7dapB benannt.

40 40 Beispiel 5

- Klonierung von lysE im Vektor pEC7

- 45 [0069] Das in Beispiel 1 beschriebene Plasmid pUC18lysEneu wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI vollständig verdaut und das 1,1 kb große BamHI Fragment mit dem lysE Gen wie in Beispiel 1 isoliert. Ebenso wurde der Vektor pEC7 mit dem Restriktionsenzym BamHI vollständig geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das BamHI Vektorfragment und das BamHI lysE Fragment wurden ligiert (Rapid DNA Ligation Kit, Boehringer Mannheim), und in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Plasmid-tragende Transformanten wurden auf Chloramphenicol-haltigem LB Agar (10 mg/l) selektioniert. Plasmid-DNA wurde isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) und durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym BamHI überprüft. Das so erhaltene Plasmid wurde pEC7lysE (Abbildung 2) genannt. Der durch Transformation des Plasmides pEC7lysE in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  erhaltene Stamm wurde DH5 $\alpha$ /pEC7lysE benannt.

50 50 Beispiel 6

- Klonierung von pyc im Vektor pEC7

- 55 [0070] Aus dem Plasmid pCRII-TOPOpyc (aus Beispiel 3) wurde das 3,8 kb große DNA-Fragment, welches das

pyc Gen aus *C. glutamicum* ATCC 13032 trägt, durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym XbaI gewonnen. Das 3,8kb große DNA Fragment wurde über Gelelektrophorese identifiziert, aus dem Gel isoliert und mit den üblichen Methoden aufgereinigt und mit Klenow Polymerase die überstehenden Enden aufgefüllt. Ebenso wurde der Vektor pEC7 mit dem Restriktionsenzym SmaI vollständig geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das SmaI Vektorfragment und das XbaI und mit Klenow behandelte, pyc Fragment wurden ligiert (T4 Ligase, Boehringer Mannheim), und in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Plasmid-tragende Transformanten wurden auf Chloramphenicol-haltigem LB Agar (10 mg/l) selektioniert. Plasmid-DNA wurde isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und durch Restriktionsspaltung mit dem Restriktionsenzym SalI überprüft. Das so erhaltene Plasmid wurde pEC7pyc (Abbildung 3) genannt. Der durch Transformation des Plasmides pEC7pyc in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  erhaltene *E. coli* Stamm wurde DH5 $\alpha$ /pEC7pyc genannt.

#### Beispiel 7

##### Herstellung eines lysE und dapB enthaltenden Plasmides

- [0071] Aus dem Plasmid pCR2.1TOPOdapB, welches das dapB Gen aus *C. glutamicum* ATCC 13032 enthält, wurde das dapB Gen als HindIII Fragment isoliert. Dazu wurde das Plasmid vollständig mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut und das dapB tragende DNA Fragment aus einem 0,8% igem Agarosegel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen).
- [0072] Außerdem wurde der Vektor pEC7lysE mit dem Restriktionsenzym HindIII vollständig verdaut und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Mit dem so erhaltenen linearen Vektorfragment wurde das 1,1 kb dapB enthaltende Fragment ligiert (T4 Ligase, Boehringer Mannheim) und der Ligationsansatz in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Plasmid-tragende Transformanten wurden auf Chloramphenicol-haltigem LB Agar (10 mg/l) selektioniert. Plasmid-DNA wurde isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und durch Restriktionsspaltung mit dem Restriktionsenzym HindIII überprüft.
- [0073] Das so erhaltene Plasmid wurde pEC7lysEdapB genannt. Dieses Plasmid ist in *Escherichia coli* und in *Corynebacterium* autonom replizierbar und verleiht seinem Wirt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol.
- [0074] Das Plasmid pEC7lysEdapB enthält gleichzeitig das dapB Gen, welches für die Dihydripicolinat Reductase kodiert und das lysE Gen, welches für den Lysinexporter kodiert.
- [0075] Der durch Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit pEC7lysEdapB erhaltene Stamm wurde DH5 $\alpha$ /pEC7lysEdapB hinterlegt.

#### Beispiel 7

##### Herstellung eines gleichzeitig dapB und pyc enthaltenden Plasmides

- [0076] Das Plasmid, welches das pyc Gen trägt, das für die Pyruvat-Carboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 kodiert, wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI vollständig gespalten und mit Klenow Polymerase wurden die überstehenden Enden wie in Beispiel 6 beschrieben aufgefüllt. So konnte das 3,8 kb große DNA Fragment isoliert werden, das das Gen für die Pyruvat-Carboxylase enthält.
- [0077] Das Plasmid pEC7dapB (aus Beispiel 4) wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI ebenfalls vollständig gespalten und die Enden mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das so erhaltene lineare Vektorfragment wurde mit dem 3,8 kb großen DNA-Fragment, welches das pyc Gen enthält, unter Verwendung der T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) ligiert. Hierdurch entstand ein Plasmid, das sowohl das dapB Gen als auch das pyc Gen aus *Corynebacterien* enthält. Plasmid-tragende Transformanten wurden auf Chloramphenicol-haltigem LB Agar (10 mg/l) selektioniert. Plasmid-DNA wurde isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und durch Restriktionsspaltung mit dem Restriktionsenzym SalI. Das Plasmid ist in Abbildung 4 dargestellt und wurde pEC7dapBpyc genannt. Der durch Transformation des Plasmides pEC7dapBpyc in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  erhaltene *E. coli* Stamm wurde DH5 $\alpha$ /pEC7dapBpyc genannt.

#### Beispiel 8

##### Herstellung eines gleichzeitig für lysE, dapB und pyc codierende Sequenzen enthaltenden Plasmides

- [0078] Das Plasmid pCRII-TOPOpyc (aus Beispiel 3), welches das pyc Gen trägt, das für die Pyruvat-Carboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 kodiert, wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI vollständig gespalten und wie in Beispiel 6 beschrieben mit Klenow Polymerase behandelt. So konnte das 3,8 kb große DNA Fragment iso-

llert werden, das das Gen für die Pyruvat-Carboxylase enthält.

[0079] Das Plasmid pEC7dapBlysE wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI ebenfalls vollständig gespalten und die Enden mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das so erhaltene lineare Vektorfragment wurde mit dem 3,8 kb großen DNA-Fragment, welches das pyc Gen enthält, unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) 5 ligiert. Hierdurch entsteht ein Plasmid, das sowohl das lysE Gen und dapB Gen als auch das pyc Gen aus *Corynebacterium glutamicum* enthält. Plasmid-tragende Transformanten wurden auf Chloramphenicol-haltigem LB Agar (10 mg/l) selektioniert. Plasmid-DNA wurde isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und durch Restriktionsspaltung mit dem Restriktionsenzym SmaI. Das Plasmid ist in Abbildung 5 dargestellt und wurde pEC7dapBlysEpyc genannt. Der durch Transformation des Plasmides pEC7dapBlysEpyc in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  10 erhaltenen *E. coli* Stamm wurde DH5 $\alpha$ /pEC7dapBlysEpyc genannt.

#### Beispiel 9

Transformation des Stammes MH20-22B mit den Plasmiden pJC23 und pJC33

[0080] Das Plasmid pJC1 ist ein in *Escherichia coli* und in *Corynebacterium glutamicum* replizierbares Plasmid (Cremer et al., 1990, Molecular and General Genetics 220:478 - 480). Davon abgeleitet ist das Plasmid pJC33 (Cremer et al., 1991, Applied and Environmental Microbiology 57 (6) 1746 - 1752), welches das lysC(Fbr) Gen aus dem *C. glutamicum* Stamm MH20-22B trägt.

[0081] Das Plasmid pJC23 basiert ebenfalls auf dem Vektor pJC1 und trägt das dapA Gen aus *C. glutamicum* ATCC 13032 (Cremer et al., 1990, Molecular and General Genetics 220:478 - 480) (EP-B 0 435 132). In den Stamm MH20-22B wurden mit der Elektroporationsmethode (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters. (61) 329 - 334 (1989)) die Plasmide pJC1, pJC33 und pJC23 eingeschleust. Der *C. glutamicum* Stamm MH20-22B ist ein AEC resistent Lysinproduzent der unter der Hinterlegungsnummer DSM5715 hinterlegt ist.

[0082] Die mit Hilfe der Elektroporation erhaltenen Transformanten wurden auf Selektionsagar (LBHIS Agar (18,5 g/l Brain-Heart Infusion Bouillon, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl, 18 g/l Bacto-Agar)) mit 15 mg/l Kanamycin isoliert. Plasmid DNA wurde nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und überprüft. Die erhaltenen Stämme wurden MH20-22B/pJC1, MH20-22B/pJC33 und MH20-22B/pJC23 genannt.

#### Beispiel 10

Transformation mit den Plasmiden pEC7pyc, pEC7dapBpyc und pEC7dapBlysEpyc

[0083] Im weiteren wurden die im Beispiel 9 hergestellten Stämme verwendet, um sie mit einem zweiten Plasmid zu versehen.

[0084] In die beschriebenen Stämme MH20-22B/pJC1, MH20-22B/pJC33 und MH20-22B/pJC23, wurden die Plasmide

- pEC7pyc (Siehe Beispiel 6)
- pEC7dapBpyc (Siehe Beispiel 7)
- pEC7dapBlysEpyc (Siehe Beispiel 8)

mit der Elektroporationsmethode eingeschleust.

[0085] Die transformierten Bakterien werden aufgrund der Antibiotika-Resistenz der enthaltenen Plasmide selektioniert. Die mit Hilfe der Elektroporation erhaltenen Transformanten wurden auf Selektionsagar (LBHIS Agar mit 15 mg/l Kanamycin und 7,5 mg/l Chloramphenicol isoliert. Plasmid DNA wurde isoliert, mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und überprüft.

[0086] Die erhaltenen Stämme sind nachfolgend aufgeführt:

DSM5715/pJC1/pEC7pyc

DSM5715/pJC33/pEC7pyc

DSM5715/pJC23/pEC7pyc

DSM5715/pJC23/pEC7dapBpyc

DSM5715/pJC23/pEC7lysEdapBpyc

## 5 Beispiel 11:

## Herstellung von L-Lysin

[0087] Die in Beispiel 9 und 10 erhaltenen verschiedenen *C. glutamicum* Stämme wurden in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

[0088] Dazu wurden die verschiedenen Stämme zunächst auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l), Chloramphenicol (10 mg/l)) 24h bei 33°C inkubiert. Ausgehend von diesen Agarplattenkulturen wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) und Chloramphenicol (10 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs OD (660nm) der Hauptkultur 0,2 OD beträgt. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

20

25

30

35

40

45

Medium MM:	
CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose	50 g/l (getrennt autoklavieren)
Salze:	
(NH4)2SO4	25 g/l
KH2PO4	0,1 g/l
MgSO4 * 7 H2O	1,0 g/l
CaCl2 * 2H2O	10 mg/l
FeSO4 * 7H2O	10 mg/l
MnSO4 * H2O	5,0mg/l
Biotin	0,3 mg/l (sterilfiltriert)
Thiamin * HCl	0,2 mg/l (sterilfiltriert)
CaCO3	25 g/l
Abkürzungen: CSL: Corn Steep Liquor MOPS: Morpolinopropansulfonsäure	

[0089] CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO3 zugesetzt.

[0090] Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) und Chloramphenicol (10 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

[0091] Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Messwellenlänge von 660nm ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt. Der Glukosegehalt wurde mit dem Zuckeranalysator der Firma Skalar Analytik GmbH (Erkelenz, Deutschland) bestimmt.

[0092] In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	Gen	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715/pJC1/ pEC7pyc	pyc	9,3	11,3
DSM5715/pJC33/ pEC7pyc	pyc, lysC (Fbr)	9,2	11,9
DSM5715/pJC23 pEC7pyc	pyc, dapA	9,3	14,4
DSM5715/pJC23 pEC7 dapBpyc	pyc, dapA, dapB	9,3	16,9
DSM5715/pJC23/ pEC7lysEdapBpyc	pyc, dapA, dapB, lysE	9,1	17,6

## Beispiel 12

## Klonierung des aecD Gens in den Vektor pUC18

[0093] Das Plasmid pSIR21 (Rossol, Dissertation, Universität Bielefeld 1992) wurde mit den Enzymen BgIII und EcoRV vollständig gespalten und das 1.4kb große DNA Fragment, welches das aecD Gen (Accessionnumber M89931) (Rossol and Pühler, Journal of Bacteriology 174 (9), 2968-2977 (1992)) aus C. glutamicum ATCC 13032 enthält, isoliert. Das isolierte DNA Fragment wurde mit dem Plasmid pUC18, das mit den Enzymen BamHI und SmaI vollständig verdaut worden war, mit Hilfe der T4 DNA Ligase wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning: a Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Hirn-Herz-Platten mit Ampicillin 100mg/l. Von einer Kolonie wurde Plasmid-DNA isoliert. Das erhaltene Plasmid wurde pUC18::aecD genannt.

## Beispiel 13

## Klonierung des dapA Gens im Plasmid pSP72

[0094] Ein dapA Genfragment wird aus dem Plasmid pJC20 (Cremer, J. Dissertation 1989, Universität Düsseldorf) als SphI-BamHI Fragment isoliert. Der Vektor pSP72 (Promega Corporation, USA) wurde mit den Enzymen SphI und BamHI vollständig gespalten und mit alkalischer Phosphatase behandelt. In diesen Vektor wurde das dapA tragende Fragment mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Die DNA wurde anschließend in den E. coli Stamm XL1 Blue (Bullock, Fernandez and Short, BioTechniques (5) 376-379 (1987)) transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB Medium mit Ampicillin 100mg/l. Aus einer Transformante wurde Plasmid-DNA isoliert und als pSP72::dapA bezeichnet.

## Beispiel 14

Mutagenese des dapA Promotors und Herstellung der Plasmide pSP72::dapA(MC20) und pSP72::dapA(MA16)

[0095] Für die Mutagenese des Promotorbereiches wurde der Quickchange site directed mutagenesis kit der Firma Stratagene verwendet. Es wurden folgende Primer anhand der vorliegenden dapA Sequenz erstellt und für die Mutagenese eingesetzt:

[0096] Für die Herstellung von pSP72::dapA(MC20)

Primer dap1 für MC20

CCA AAT GAG AGA TGG TAA CCT TGA ACT CTA TGA GCA

Primer dap2 für MC20

GTC CTC ATA GAG TTC AAG GTT ACC ATC TTC CCT CAT TTG G

[0097] Für die Herstellung von pSP72::dapA(MA16)

Primer dap3 für MA16

CCA AAT GAG GGA AGA AGG TAT AAT TGA ACT CTA TGA GCA

## Primer dap4 für MA16

5 GTG CTC ATA GAG TTC AAT TAT ACC TTC CCT CAT TTG G

- [0098] Die PCR Reaktion erfolgte, wie vom Hersteller (Stratagene) des Quickchange site directed mutagenesis kits angegeben und unter Verwendung des Plasmides pSP72: :dapA (aus Beispiel 13) als Template.
- [0099] Es erfolgte die Transformation der Mutageneseansätze in den E. coli Stamm XL1-Blue. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB Medium mit Carbenicillin 100mg/l. Aus einer Transformante wurde Plasmid-DNA isoliert, durch BstEII Verdau wurde der Wegfall der BstEII Schnittstelle kontrolliert. Plasmide, die keine BstEII Schnittstelle mehr tragen, wiesen die gewünschte Mutation auf.
- [0100] Die erhaltenen Plasmide wurden in die dapA defekte E. coli Mutante RDA8 transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB mit Carbenicillin 100mg/l ausplattiert, um die Komplementation der dapA Mutation zu testen. Aus je einer der Transformanten wurde DNA isoliert und die erhaltenen Plasmide wurden pSP72: :dapA(MC20) und pSP72: :dapA(MA16) genannt. Es erfolgte die Sequenzierung der Plasmide unter Verwendung der reverse und universal sequencing Primer nach der bei Sanger et al., Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, (74) 5463 - 5467 (1977) beschriebenen Kettenabbruch-Methode. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des Auto-Read Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die elektrophoretische Analyse und Detektion der Sequenzierprodukte wurde mit dem A.L.F.-DNA-Sequenzierer (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) durchgeführt.

## Beispiel 15

25 Herstellung der Plasmide pK19mobsacBaecD: :dapA(MC20) und pK19mobsacBaecD: :dapA(MA16) (Umklonierung der mutagenisierten Fragmente)

- [0101] Die Plasmide pSP72: :dapA(MC20) und pSP72: :dapA(MA16) (aus Beispiel 14) wurden mit den Restriktionsenzymen Pvull und Smal vollständig geschnitten. Die 1450 bp großen Pvull-Smal Fragmente, welche das dapA Gen mit dem mutierten Promotor MC20 bzw. MA16 tragen, wurden mit der T4-DNA-Ligase in den StuI geschnittenen Vektor pUC18: :aecD (aus Beispiel 12) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB Medium mit Ampicillin 100mg/l. Aus je einer Transformante wurde Plasmid-DNA isoliert. Auf diese Weise erhielt man die Plasmide pUC18aecD: :dapA(MC20) und pUC18aecD: :dapA(MA16).
- [0102] Die Plasmide pUC18aecD: :dapA(MC20) und pUC18aecD: :dapA(MA16) wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI partiell und mit dem Enzym Sall vollständig gespalten, um das 3,0 kb große aecD: :dapA(MA16) bzw aecD: :dapA(MC20) tragende Fragment zu erhalten. Das Fragment wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in den geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pK19mobsacB (Schäfer et al., Gene (145) 69-73 (1994)) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 (Hanahan (1985), In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB Medium mit Kanamycin 50mg/l. Aus je einer Transformante wurde Plasmid-DNA isoliert. Auf diese Weise erhielt man die Plasmide pK19mobsacBaecD: :dapA(MC20) und pK19mobsacBaecD: :dapA(MA16).
- [0103] Die Plasmid DNA wurde in den E. coli Stamm S17-1 (Simon, Priester and Pühler, Bio/Technology, (1) 784-791 (1983)) transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB Medium mit Kanamycin 50mg/l. Aus je einer Transformante wurde Plasmid-DNA isoliert und überprüft. Die erhaltenen Stämme wurden S17-1/pK19mobsacBaecD: :dapA(MC20) und S17-1/pK19mobsacBaecD: :dapA(MA16) genannt.

## Beispiel 16

50 Herstellung der C. glutamicum Stämme DSM5715aecD: :dapA(MC20) und DSM5715aecD: :dapA(MA16)

- [0104] Die Plasmide pK19mobsacBaecD: :dapA(MC20) und pK19mobsacBaecD: :dapA(MA16) wurden mit der Methode der Konjugation (Schäfer et al., Journal of Bacteriology, (172) 1663-1666 (1990)) von S17-1/pK19mobsacBaecD: :dapA(MC20) und S17-1/pK19mobsacBaecD: :dapA(MA16) (aus Beispiel 15) in den C. glutamicum Stamm DSM5715 übertragen. Zur Selektion der Transkonjuganten wurden die Konjugationsansätze auf Hirn-Herz-Medium mit Nalidixinsäure und Kanamycin ausplattiert. Die erhaltenen Transkonjuganten wurden über Nacht in 10 ml Hirn-Herz-Medium inkubiert. Anschließend wurden Aliquots auf Sucrose-haltigen Platten (Hirn-Herz Agar mit 10% Sucrose) ausplattiert, um auf den Verlust der Sucrosesensitivität zu selektionieren. Sucrose-resistente Klone wurden isoliert und erneut auf Chloramphenicol und Kanamycin haltigen Agar-Platten (Hirn-Herz-Medium mit Kanamycin

15mg/l und Hirn-Herz-Medium mit Chloramphenicol 10 mg/l) überprüft.

5 [0105] Isoliert wurden Kolonien, die den folgenden Phänotyp aufwiesen:

Sucrose resistant  
Kanamycin sensitiv  
Chloramphenicol sensitiv.

[0106] Die Insertion des dapA Genfragmente in das aecD-Gen wurde mit der Methode des Southern-Blots (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) überprüft.

10 Beispiel 17

Herstellung der C. glutamicum Stämme

15 [0107]

DSM5715aecD::dapA(MC20) /pEC7pyc,  
DSM5715aecD::dapA(MA16) /pEC7pyc,  
DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7, DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7 und DSM5715/pEC7

20 [0108] Das Gen pyc liegt wie in Beispiel 6 beschrieben im Vektor pEC7 vor. Dieses Plasmid pEC7pyc sowie das Plasmid pEC7 wurde mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) in die Stämme DSM5715aecD::dapA(MC20), DSM5715aecD::dapA(MA16) und DSM5715 (aus Beispiel 16) eingebracht, um so C. glutamicum DSM5715aecD::dapA(MC20) /pEC7pyc, DSM5715aecD::dapA(MA16) /pEC7pyc, DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7, DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7 und DSM5715/pEC7 zu erhalten. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin 25mg/l. Aus je einer Transformante wurde Plasmid-DNA isoliert und überprüft.

Auf diese Weise erhielt man die Stämme

30 [0109]

DSM5715aecD::dapA(MC20) /pEC7pyc,  
DSM5715aecD::dapA(MA16) /pEC7pyc,  
DSM5715aecD::dapA(MC20) /pEC7,  
DSM5715aecD::dapA(MA16) /pEC7 und  
DSM5715/pEC7.

40 Beispiel 18

45 Herstellung von Lysin mit den in Beispiel 17 hergestellten Stämmen

[0110] Die Stämme DSM5715aecD::dapA(MC20) /pEC7pyc, DSM5715aecD::dapA(MA16) /pEC7pyc, DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7, DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7 und DSM5715/pEC7 wurden wie in Beispiel 11 beschrieben nach Vorkultivierung in Medium CgII (Kase & Nakayama, Agricultural and Biological Chemistry 36 (9) 1611- 1621 (1972)) im Produktionsmedium MM kultiviert. Nach 48 Stunden Inkubation wurde die optische Dichte bei 660nm und die Konzentration an gebildetem L-Lysin bestimmt.

[0111] In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

50

Tabelle 2

Stamm	OD	Lysin-HCl g/l
DSM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7pyc	14,15	13,3
DSM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7pyc	13,6	13,4
DSM5715/pEC7	13,3	11,5

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Stamm	OD	Lysin-HCl g/l
DM5715aecD::dapA(MA16)/pEC7	13,3	12,9
DM5715aecD::dapA(MC20)/pEC7	14,0	12,8

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

## SEQUENZPROTOKOLL

5           <110> Degussa-Hüls AG  
             Forschungszentrum Jülich GmbH

10          <120> L-Lysin produzierende coryneformen Bakterien und  
             Verfahren zur Herstellung von Lysin.

15          <130> 980183 BT

20          <140>  
             <141>

25          <160> 6

30          <170> PatentIn Ver. 2.1

35          <210> 1  
             <211> 795  
             <212> DNA  
             <213> *Corynebacterium glutamicum*

40          <220>  
             <221> -35 signal  
             <222> (774)..(779)

45          <220>  
             <223> DNA stromaufwärts von dapB

50          <400> 1  
ctgcagcaat gagaccgagt aatttcgggg ttgaccagat acaccaatga gaacttggga 60  
acgggttca aaaatactgg tgaagtttat gtcttcaaca atgcctgcac caggatatga 120  
tccggatcg atacctggaa cgacaacctg atcaggatat ccagtgcctt gaatattgac 180  
tttgaggaaag gaatcaccag ccatctcaac tggaaagacct gacgcctgtc gaattggatc 240  
agtggcccaa tcgaccacc aaccaggatg gccattaccg gcgatatacaa aaacaactcg 300  
tgtgaacgtt tcgtgctcg caacgcggat gccagcgatc gacatatacg agtcaccaac 360  
tttagcctgc tgcttctgat ccatcgacgg ggaacccaac ggcggcaaaag cagtggggga 420  
agggggagt ttggtgact ctgaaccgg tggctctga atgtgttaggc gacggggcag 480  
ctatctgaag gcgtgcgagt tgtggtgacc gggtttagcgg tttcagtttgc tgcacaact 540  
ggagcaggac tagcagaggt ttaggcgtt gagccgccttc catcacaagc actaaaaagt 600  
aaagaggcgg aaaccacaaag cgccaaggaa ctactgcgg aacgggcggtg aaggcaact 660  
taatgtctcat atttcaaaca tagttccacc tgtgtgatta atccctagaa cggaacaaac 720  
tgatgaacaa tcgttaacaa cacagaccaa aacggtcagt taggttatggta tatcagcacc 780  
ttctgaacgg gtacg 795

55          <210> 2  
             <211> 1815  
             <212> DNA  
             <213> *Corynebacterium glutamicum*

60          <220>  
             <221> -35\_signal  
             <222> (774)..(779)

65          <220>  
             <221> -10\_signal  
             <222> (798)..(803)

70          <220>  
             <221> CDS  
             <222> (851)..(1594)

75          <400> 2  
ctgcagcaat gagaccgagt aatttcgggg ttgaccagat acaccaatga gaacttggga 60

acgggcttca aaaatactgg tgaagtttatcgtatcgat gtcattcaaca atgcctgcac caggatatga 120  
 tccggtatcg atacctggaa cgacaaacctg atcaggatat ccagtgcctt gaatattgac 180  
 gttgaggaag gaatcaccag ccatctcaac tggaagacct gacgcctgtc gaattggatc 240  
 agtggcccaa tcgaccacc aaccagggtt gccattaccg gcgatataa aaacaactcg 300  
 tgtgaacgtt tcgtgctcg caacgcggat gccagcgatc gacatatacg agtcaccaac 360  
 ttgagcctgc tgcttcgtat ccatcgacgg ggaacccaac ggcggcaaag cagtggggga 420  
 aggggggagt ttggtgcaact ctgaaccggag tggctctga agtggtaggc gacggggcag 480  
 ctatctgaag gcgtgcgagt tgtggtgacc gggtagcgg tttcagtttgc tgcacacaact 540  
 ggagcaggac tagcagaggt tgttaggcgtt gagccgccttc catcacaagc actaaaaagt 600  
 aaagaggcgg aaaccacaag cgccaaggaa ctactgcgga acggcggtg aaggcaact 660  
 taagtctcat atttcaaaca tagttccacc tgtgtgattt atccctagaa cggAACAAAC 720  
 tcatgaacaa tcgttaacaa cacagaccaa aacggtcagt taggtatgga tatcagcacc 780  
 ttctgaacgg gtacgtctag actgggtggc gtttggaaaatccttcgccc cacggaaaatg 840  
 aaggagcata atg gga atc aag gtt ggc gtt ctc gga gcc aaa ggc cgt 889  
     Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg  
     1                 5   10  
  
 gtt ggt caa act att gtg gca gca gtc aat gag tcc gac gat ctg gag 937  
   Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu  
   15                 20                                       25  
  
 ctt gtt gca gag atc ggc gtc gac gat gat ttg agc ctt ctg gta gac 985  
   Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp  
   30                 35                                       40                       45  
  
 aac ggc gct gaa gtt gtc gtt gac ttc acc act cct aac gct gtg atg 1033  
   Asn Gly Ala Glu Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met  
   50                 55                                       60  
  
 ggc aac ctg gag ttc tgc atc aac aac ggc att tct gcg gtt gtt gga 1081  
   Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly  
   65                 70                                       75  
  
 acc acg ggc ttc gat gat gct cgt ttg gag cag gtt cgc gac tgg ctt 1129  
   Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Asp Trp Leu  
   80                 85                                       90  
  
 gaa gga aaa gac aat gtc ggt gtt ctg atc gca cct aac ttt gct atc 1177  
   Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile  
   95                 100                                       105  
  
 tct gcg gtg ttg acc atg gtc ttt tcc aag cag gct gcc cgc ttc ttc 1225  
   Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe  
   110                 115                                       120                       125  
  
 gaa tca gct gaa gtt att gag ctg cac cac ccc aac aag ctg gat gca 1273  
   Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala  
   130                 135                                       140

cct tca ggc acc gcg atc cac act gct cag ggc att gct gcg gca cgc 1321  
 Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg  
 145 150 155

5  
 aaa gaa gca ggc atg gac gca cag cca gat gcg acc gag cag gca ctt 1369  
 Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu  
 160 165 170

10  
 gag ggt tcc cgt ggc gca agc gta gat gga atc ccg gtt cat gca gtc 1417  
 Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val  
 175 180 185

cgc atg tcc ggc atg gtt gct cac gag caa gtt atc ttt ggc acc cag 1465  
 Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln  
 190 195 200 205

15  
 ggt cag acc ttg acc atc aag cag gac tcc tat gat cgc aac tca ttt 1513  
 Gly Gln Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe  
 210 215 220

20  
 gca cca ggt gtc ttg gtg ggt gtg cgc aac att gca cag cac cca ggc 1561  
 Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly  
 225 230 235

cta gtc gta gga ctt gag cat tac cta ggc ctg taaaaggctca tttcagcage 1614  
 Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu  
 240 245

25  
 gggttggaaatt tttaaaagg agcgttaaa ggctgtggcc qaacaagtta aattgagcgt 1674  
 ggagttgata gcgtgcagtt cttttactcc acccgctgat gtttagtggt caactgatgt 1734  
 tgagggcgcg gaagcactcg tcgagtttgc gggtcgtgcc tgctacgaaa cttttgataa 1794  
 gccgaacctt cgaactgctt c 1815

30  
 <210> 3  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

35  
 <400> 3  
 Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg Val Gly Gln  
 1 5 10 15

40  
 Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala  
 20 25 30

Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asn Gly Ala  
 35 40 45

45  
 Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Leu  
 50 55 60

Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly Thr Thr Gly  
 65 70 75 80

Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Asp Trp Leu Glu Gly Lys  
 85 90 95

50  
 Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile Ser Ala Val  
 100 105 110

Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe Glu Ser Ala  
 115 120 125  
 5 Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala Pro Ser Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ala  
 145 150 155 160  
 10 Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu Glu Gly Ser  
 165 170 175  
 Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val Arg Met Ser  
 180 185 190  
 15 Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln Gly Gln Thr  
 195 200 205  
 Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe Ala Pro Gly  
 210 215 220  
 20 Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly Leu Val Val  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu  
 245

25 <210> 4  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 30 <223> dapA Wildtyp-Promotor  
 <400> 4  
 gttaggtttt ttgcggggtt gtttaacccc caaatgaggg aagaaggtaa ctttgaactc 60  
 tatgagcaca ggttaaca 79  
 35 <210> 5  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 40 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 dapA-Promotor von C. glutamicum mit der  
 MC20-Mutation  
 <220>  
 <221> mutation  
 <222> (45)  
 45 <400> 5  
 gttaggtttt ttgcggggtt gtttaacccc caaatgaggg aagatggtaa ctttgaactc 60  
 tatgagcaca ggttaaca 79  
 50 <210> 6  
 <211> 80  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

5           <220>  
       <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
             dapA-Promotor von C. glutamicum mit der  
             MA16-Mutation

10          <220>  
       <221> mutation  
       <222> (35)..(53)

15          <400> 6  
          gttaggttt ttgcgggtt gtttaacccc caaaatgagg gaagaaggta taattgaact 60  
          ctatgagcac aggttaaca   80

15

### Abbildungen

20 [0112] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

- Abbildung 1: pEC7dapB (Siehe Beispiel 4)
- Abbildung 2: pEC7lysE (Siehe Beispiel 5)
- 25        • Abbildung 3: pEC7pyc (Siehe Beispiel 6)
- Abbildung 4: pEC7dapBpyc (Siehe Beispiel 7)
- 30        • Abbildung 5: pEC7lysEdapBpyc (Siehe Beispiel 8)

[0113] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

35	Cm:	Resistenzgen für Chloramphenicol
	dapB:	dapB-Gen von C. glutamicum
	lysE:	lysE-Gen von C. glutamicum
40	pyc:	pyc-Gen von C. glutamicum
	OriE:	Plasmidkodierter Replikationsursprung E. coli
	pBL:	DNA-Fragment des Plasmids pBL1
45	EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
	EcoRV:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRV
50	HincII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HincII
	HindIII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
	KpnI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms KpnI
55	Sall:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sall
	Smal:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms Smal

SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI  
 Pvull: Schnittstelle des Restriktionsenzym Pvull  
 5 BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI

**Patentansprüche**

1. L-Lysin produzierende coryneforme Bakterien mit einem verstärktem pyc-Gen, in denen zusätzlich Gene, ausgewählt aus der Gruppe dapA-Gen, lysC-Gen, lysE-Gen und dapB-Gen, einzeln oder gemeinsam, verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
  2. Coryneforme Bakterien gemäß Anspruch 1, in denen das dapA-Gen und gegebenenfalls das dapB-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
  3. Coryneforme Bakterien gemäß Anspruch 1, in denen das dapA-Gen, das dapB-Gen und das lysE-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
  4. Coryneforme Bakterien gemäß Anspruch 1, die die Mutationen MC20 oder MA16 des dapA-Promoters, dargestellt in SEQ-ID-No. 5 und SEQ-ID-No. 6, auweisen.
  5. Coryneforme Bakterien gemäß Anspruch 1, in denen das dapB-Gen, das zusätzlich den 5' Bereich vor dem Translationsstart dieses Gens, dargestellt in der SEQ-ID-No. 1, enthält, verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
  6. In coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der Herkunft Corynebacterium, die zumindest die Nukleotidsequenz enthält, die zusätzlich den 5' Bereich vor dem Translationsbereich des dapB-Gens, dargestellt in der SEQ-ID-No. 1, enthält.
  7. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5 mit der Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1.
  8. Verfahren zur Herstellung von L-Lysin durch Fermentation coryneformer Bakterien mit einem verstärkten pyc-Gen, dadurch gekennzeichnet,
- daß man Bakterien einsetzt, in denen man Nukleotidsequenzen, codierend für die Gene, ausgewählt aus der Gruppe dapA, lysC, lysE und dapB, einzeln oder gemeinsam verstärkt, insbesondere überexprimiert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
- daß man Bakterien einsetzt, in denen man das dapA-Gen und gegebenenfalls gleichzeitig das lysC-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 45 10. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
- daß man Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das dapA-Gen, das dapB-Gen und das lysE-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 50 11. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
- daß man einen mit einem oder mehreren Plasmivektor(en) transformierten Stamm einsetzt, wobei der (die) Plasmidvektor(en) die Nucleotidsequenzen für eines oder mehrere der zu verstärkenden Gene trägt (tragen).
- 55 12. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,

daß man einen mit einem oder mehreren Plasmidvektor(en) transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die Nucleotidsequenzen trägt, die für eine oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe Gene pyc, dapA, dapB und/oder lysE codieren.

- 5    13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,

daß man Bakterien der Gattung *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.

- 10   14. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,

daß man folgende Schritte durchführt:

- 15      a) Fermentation der L-Lysin produzierenden Bakterien, in denen die beschriebenen Gene verstärkt werden,  
b) Anreicherung von L-Lysin im Medium oder in den Zellen der Bakterien und  
c) Isolieren des L-Lysins.

20   15. *Escherichia coli* K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7lysE, hinterlegt als DSM 12871.

16. *Escherichia coli* K-12 Stamm DH5 $\alpha$ /pEC7dapBlysE, hinterlegt als DSM 12875.

17. *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715/pJC23, hinterlegt als DSM 12869.

- 25   18. *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715aecD::dapA(MA16), hinterlegt als DSM12867.

19. *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715aecD::dapA(MC20), hinterlegt als DSM12868.

30   20. *Corynebacterium glutamicum* Stamm 678, hinterlegt als DSM 12866.

21. Replizierbare DNA mit der Nukleotidsequenz MC20, gezeigt in der SEQ-ID-No. 5.

22. Replizierbare DNA mit der Nukleotidsequenz MA16, gezeigt in der SEQ-ID-No. 6.

35

40

45

50

55

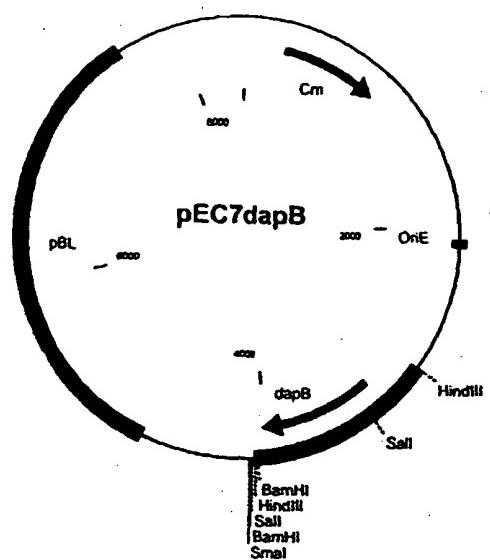


Abbildung 1: Plasmid pEC7dapB

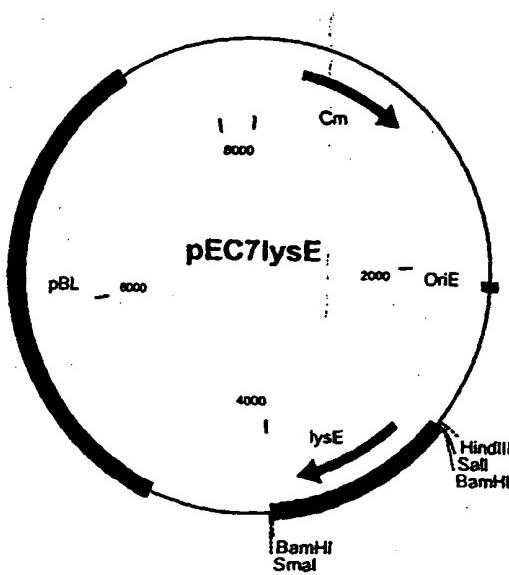


Abbildung 2: Plasmid pEC7lysE

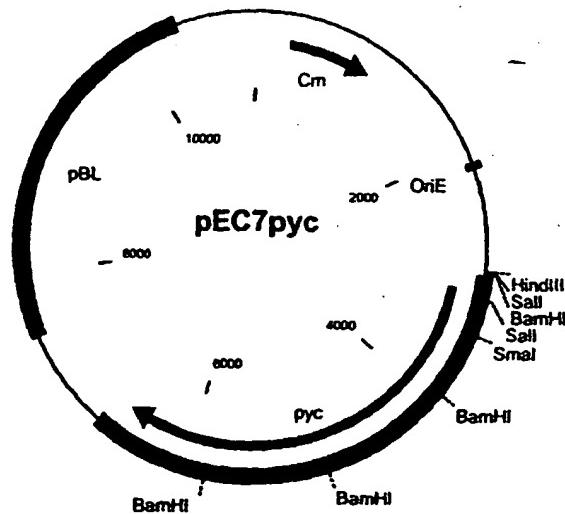


Abbildung 3: Plasmid pEC7pyc

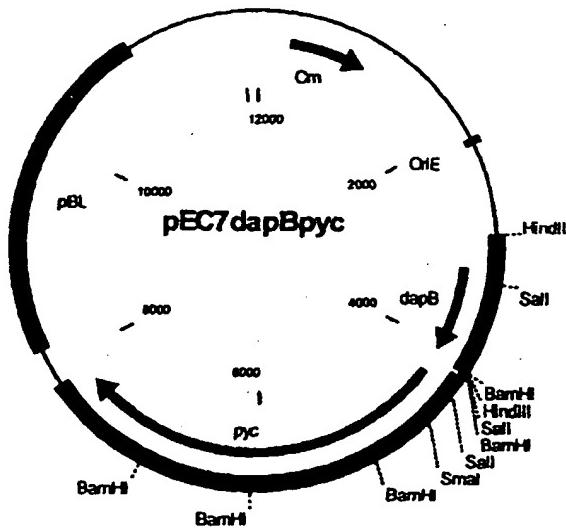


Abbildung 4: Plasmid pEC7 dapBpyc

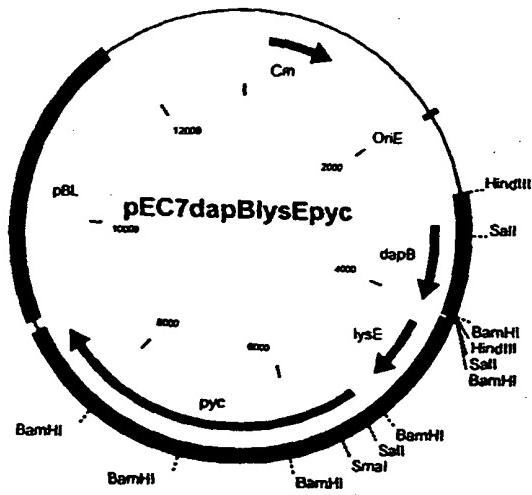


Abbildung 5: pEC7dapBlysEpyc



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 00 11 4502

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrieb Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	DE 198 31 609 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 15. April 1999 (1999-04-15) * Seite 3, Zeile 27-29 * * Anspruch 8 * * Seite 5; Beispiel 4 * * Seite 3, Zeile 45 *	1,8, 11-14	C12N15/77 C12N15/70 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/63 C12N9/10 C12P13/08 C12N1/21
Y	DE 195 48 222 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 26. Juni 1997 (1997-06-26) * Seite 5, Zeile 41-56 *	1-3,6-14 1-3,8-14	
Y	EP 0 435 132 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 3. Juli 1991 (1991-07-03) * Seite 2, Zeile 57 – Seite 3, Zeile 10 *	2,3,8-14	
Y	EP 0 854 189 A (AJINOMOTO KK) 22. Juli 1998 (1998-07-22) * das ganze Dokument *	2,3,8-14	
Y	DATABASE EMBL 'Online! Accession No. X67737, 1. April 1993 (1993-04-01) "C. glutamicum dapB gene for dihydrodipicolinate reductase" XP002151598 * das ganze Dokument *	6,7	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7) C12N C12P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
MÜNCHEN	2. November 2000	Herrmann, K	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldeatum veröffentlicht worden ist D : In der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 11 4502

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

02-11-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19831609 A	15-04-1999	AU	1148299 A	27-04-1999
		BR	9813021 A	15-08-2000
		WO	9918228 A	15-04-1999
		EP	1015621 A	05-07-2000
DE 19548222 A	26-06-1997	AU	724536 B	21-09-2000
		AU	1921897 A	17-07-1997
		BR	9612666 A	05-10-1999
		CA	2241111 A	03-07-1997
		CN	1209169 A	24-02-1999
		WO	9723597 A	03-07-1997
		EP	0868527 A	07-10-1998
		JP	2000507086 T	13-06-2000
		ZA	9610768 A	31-07-1998
EP 0435132 A	03-07-1991	DE	3943117 A	04-07-1991
		DE	59006837 D	22-09-1994
EP 0854189 A	22-07-1998	BR	9706059 A	05-10-1999
		HU	9702360 A	28-06-1999
		JP	10215883 A	18-08-1998
		PL	323546 A	08-06-1998
		SK	163697 A	08-07-1998
		US	6004773 A	21-12-1999